

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

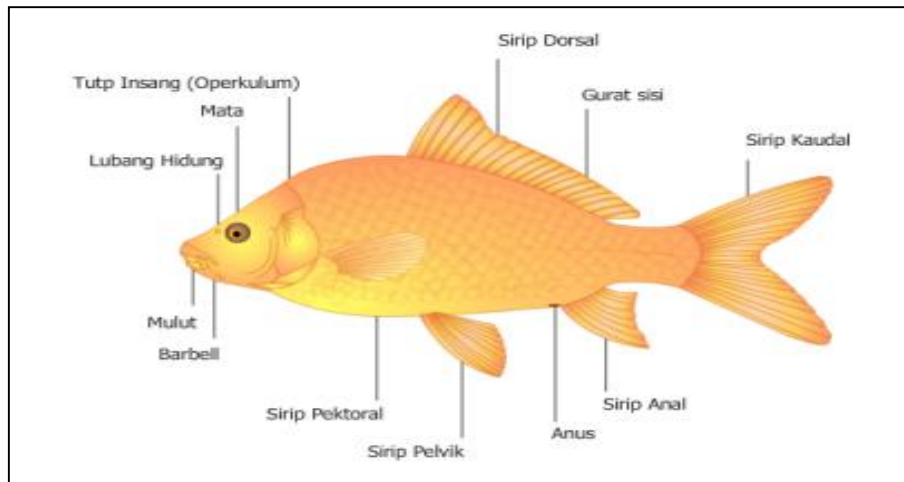
#### 2.1.1 Klasifikasi dan morfologi

Tubuh ikan Mas (*Cyprinus carpio*) berbentuk agak memanjang dan memipih tegak (*compressed*), mulut terletak dibagian tengah ujung kepala (*terminal*) dan dapat disembulkan (*protaktile*). Dibagian anterior mulut terdapat dua pasang sungut. Diujung dalam mulut terdapat gigi kerongkongan (*pharyngeal teeth*) yang terbentuk atas tiga baris gigi geraham. Warna tubuhnya bermacam-macam ada yang merah, hijau, biru keperakan, hitam, kuning muda, coklat keemasan, dan berbelang-belang campuran dari beberapa warna (Rukmana, 2003). Secara umum, hampir semua tubuh ikan Mas tertutupi sisik, kecuali beberapa strain yang hanya memiliki sisik sedikit dan tipe sisiknya adalah sisik tipe sikloid (lingkaran) (Amri, 2002).

Klasifikasi ikan Mas menurut Khairuman dan Sudenda (2002) adalah sebagai berikut :

*Phylum* : Chordata  
*Subphylum* : Vertebrata  
*Superclass* : Pisces  
*Class* : Osteichthyes  
*Subclass* : Actinopterygii  
*Ordo* : Cypriniformes  
*Subordo* : Cyprinoidea  
*Family* : Cypridae  
*Subfamily* : Cyprinidae  
*Genus* : Cyprinus  
*Species* : *Cyprinus carpio*

Berdasarkan klasifikasi di atas morfologi ikan Mas (*Cyprinus carpio*) dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Morfologi Tubuh Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)  
(Sumber : AST.Afandi. [www.mediaajar.com](http://www.mediaajar.com).2011)

Sirip punggungnya (*dorsal*) memanjang dengan bagian belakang berjari keras dan bagian akhir (sirip ketigadan keempat) bergerigi. Letak sirip punggung berseberangan dengan permukaan sirip perut (*ventral*). Sirip duburnya (*anal*) mempunyai ciri seperti sirip punggung, yakni berjari keras dan bagian akhirnya bergerigi. Garis rusuknya (*linea lateralis* atau gurat sisi) tergolong lengkap, berada di pertengahan permukaan tubuh dengan bentuk melintang dari tutup insang sampai ke ujung belakang pangkalekor (Khairuman dan Amri 2011).

### **2.1.2 Habitat dan kebiasaan makan**

Ikan Mas menyukai tempat hidup (*habitat*) di perairan tawar yang airnya tidak terlalu dalam dan alirannya tidak terlalu deras, seperti di pinggiran sungai atau danau. Ikan Mas dapat hidup baik di daerah dengan ketinggian 150–600 meter di atas permukaan air laut (dpl) dan

pada suhu 25-30°C. Meskipun tergolong ikan air tawar, ikan Mas terkadang ditemukan di perairan payau atau muara sungai yang bersalinitas (kadargaram) 25-30‰ (Suseno, 2000).

Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) merupakan ikan pemakan segala (*omnivora*). Kebiasaan makan ikan mas (*Cyprinus carpio*) yaitu sering mangaduk-ngaduk dasar kolam, termasuk dasar pematang untuk mencari jasad-jasad organik. Karena kebiasaan makannya seperti ini, ikan mas (*Cyprinus carpio*) dijuluki sebagai *bottom feeder* atau pemakan dasar. Di alam, ikan ini hidup menepi sambil mengincar makanan berupa binatang-binatang kecil yang biasanya hidup dilapisan lumpur tepi danau atau sungai (Susanto, 2004).

### **2.1.3 Reproduksi ikan mas**

Sistem reproduksi ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yaitu ovipar dimana perkembangbiakan seksual yang ditandai dengan pelepasan sel telur jantan dan betina, dimana *spermatozoa* diluar tubuh dan fertilisasi terjadi diluar tubuh. Ciri-ciri lain adalah sel telur berukuran besar karena banyak mengandung kuning telur yang dapat menjadi bekal bagi anak-anaknya dalam mengawali hidupnya diluar tubuh (Susanto, 2004).

Siklus hidup ikan Mas dimulai dari perkembangan di dalam gonad (*ovarium* pada ikan betina yang menghasilkan telur dan testis pada ikan jantan yang menghasilkan *sperma*). Sebenarnya, pemijahan ikan Mas dapat terjadi sepanjang tahun dan tidak tergantung pada musim. Namun, di habitat aslinya ikan Mas sering memijah pada awal

musim hujan, karena adanya rangsangan dari aroma tanah kering yang tergenang air. Secara alami, pemijahan terjadi pada tengah malam sampai akhir fajar. Menjelang memijah, induk-induk ikan Mas aktif mencari tempat yang rimbun, seperti tanaman air atau rerumputan yang menutupi permukaan air. Substrat inilah yang nantinya akan digunakan sebagai tempat menempel telur sekaligus membantu perangsangan ketika terjadi pemijahan (Suseno, 2000).

Sifat telur ikan Mas adalah menempel pada substrat. Telur ikan Mas berbentuk bulat, berwarna bening, berdiameter 1,5-1,8 mm, dan berbobot 0,17-0,20 mg. Ukuran telur bervariasi, tergantung dari umur dan ukuran atau bobot induk. Embrio akan tumbuh di dalam telur yang telah dibuahi oleh spermatozoa (Susanto, 2007). Antara 2-3 hari kemudian, telur-telur akan menetas dan tumbuh menjadi larva. Larva ikan Mas mempunyai kantong kuning telur yang berukuran relatif besar sebagai cadangan makanan bagi larva. Kantong kuning telur tersebut akan habis dalam waktu 2-4 hari. Larva ikan Mas bersifat menempel dan bergerak vertikal. Ukuran larva antara 0,5-0,6 mm dan bobotnya antara 18-20 mg. Larva berubah menjadi kebul (larva stadia akhir) dalam waktu 4-5 hari. Pada stadia kebul ini, ikan Mas memerlukan pasokan makanan dari luar untuk menunjang kehidupannya. Pakan alami kebul terutama berasal dari zooplankton, seperti rotifera, moina, dan daphnia. Kebutuhan pakan alami untuk kebul dalam satu hari sekitar 60-70% dari bobotnya (Susanto, 2007).

Setelah 2-3 minggu, kebul tumbuh menjadi burayak yang berukuran 1-3 cm dan bobotnya 0,1-0,5 gram. Antara 2-3 minggu kemudian, burayak tumbuh menjadi putihan (benih yang siap untuk didederkan) yang berukuran 3-5 cm dan bobotnya 0,5-2,5 gram. Putihan tersebut akan tumbuh terus. Setelah tiga bulan berubah menjadi gelondongan yang bobot per ekornya sekitar 100 gram. Gelondongan akan tumbuh terus menjadi induk. Setelah enam bulan dipelihara, bobot induk ikan jantan bisa mencapai 500 gram. Sementara itu, induk betinanya bisa mencapai bobot 1,5 kg setelah berumur 15 bulan (Susanto, 2007).

## **2.2 Pertumbuhan**

Pertumbuhan adalah pertambahan ukuran, baik panjang maupun berat dalam waktu tertentu. Jadi untuk menghitung pertumbuhan diperlukan data panjang atau bobot dan umur atau waktu. Menurut Handayani dan Widodo (2010), pertumbuhan dapat dianggap sebagai hasil dari dua proses yaitu, proses yang cenderung untuk menurunkan energi tubuh yang menjadi nyata jika seekor ikan dipelihara dalam jangka waktu yang lebih lama tanpa diberi makanan dan suatu proses yang diawali dari pengambilan makanan dan yang diakhiri dengan penyusunan unsur-unsur tubuh.

Pertumbuhan dipengaruhi oleh 2 faktor yaitu, faktor dalam dan faktor luar. Faktor dalam adalah genetik, genetik mempengaruhi laju pertumbuhan ikan, dimana setiap spesies atau varietas (*strain*) mempunyai laju pertumbuhan yang berbeda. Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Listiyowati dkk, 2008 dalam Aribowo, (2010) tentang laju pertumbuhan

beberapa *strain* ikan Tilapia, yaitu Red Nifi, Nirwana, Gesit dan Gift yang dipelihara dalam 3 tempat, yaitu keramba jaring apung (KJA), kolam dan tambak selama 12 minggu. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa pada pemeliharaan di KJA ikan Nila Gift menghasilkan biomassa tertinggi yaitu 40,02 kg, pemeliharaan di kolam ikan Nila Nirwana menghasilkan biomassa tertinggi yaitu 96,43 kg, dan pada pemeliharaan di tambak ikan Nila Nirwana juga menghasilkan biomassa tertinggi yaitu 77,79 kg.

Kemudian Ariyanto dan Subagyo (2004) juga melakukan penelitian terhadap beberapa *strain* ikan Mas dan persilangannya. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa setelah dipelihara selama 3 bulan, ternyata bobot rata-rata ikan Mas antar strain dan persilangannya berbeda. Hal ini tentunya disebabkan karena laju pertumbuhan ikan Mas tersebut berbeda antar strain dan persilangannya.

Faktor luar adalah lingkungan dan pakan, faktor lingkungan yang memegang peranan penting dalam pertumbuhan ikan adalah zat hara dan suhu lingkungan. Di daerah tropis, makanan merupakan faktor yang lebih penting dari suhu perairan. Bila keadaan faktor-faktor lain normal, ikan dengan makanan berlebih akan tumbuh lebih pesat. Zat hara bisa meliputi air, makanan dan oksigen.

Ketersediaan pakan yang berkualitas dalam jumlah yang cukup pada waktu yang tepat merupakan salah satu faktor yang sangat penting dalam pemeliharaan ikan. Penyediaan pakan yang tidak sesuai dengan kebutuhan ikan yang dipelihara menyebabkan pertumbuhan ikan menjadi lambat, dan akibatnya produksi yang dihasilkan tidak sesuai dengan yang diharapkan.

Sedangkan apabila penyediaan pakan sesuai dengan kebutuhan ikan, maka laju pertumbuhan ikan baik, maka waktu pemeliharaan akan menjadi lebih singkat sehingga produksi kolam ikan (hasil panen) juga meningkat. Jadi pakan ikan yang baik harus mengandung nutrisi (zat gizi) yang cukup sesuai dengan kebutuhan ikan, diantaranya adalah energi, protein, lemak, karbohidrat, vitamin dan mineral (Mudjiman, 2008).

Laju pertumbuhan spesifik (*Specific Growth Rate*) adalah pertambahan berat ikan setiap harinya selama masa penelitian. Untuk menentukan laju pertumbuhan spesifik sesuai dengan Handajani dan Widodo (2010):

$$SGR = \frac{\ln W_t - \ln W_0}{t} \times 100\%$$

Keterangan :

SGR = Laju pertumbuhan berat spesifik (% BW/ hari)

Wt = Bobot biomassa pada akhir penelitian (gram)

Wo = Bobot biomassa pada awal penelitian (gram)

t = Waktu penelitian

### 2.3 Sintasan

Sintasan adalah persentase jumlah ikan yang hidup dalam kurun waktu tertentu. Sintasan organisme dipengaruhi oleh padat penebaran dan faktor lainnya seperti, umur, pH, suhu dan kandungan amoniak. Faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan adalah tersedianya jenis makanan serta adanya lingkungan yang baik seperti oksigen, amoniak, karbondioksida, nitrat, hidrogen sulfida dan ion hidrogen (Effendie, 2002). Menurut Mudjiman (2004), tingkat kelangsungan hidup (SR) adalah prosentase jumlah benih ikan yang masih hidup pada akhir penelitian. Untuk mempertahankan kelangsungan hidup dan pertumbuhan ikan, maka

diperlukan makanan yang memenuhi kebutuhan nutrisi ikan. Makanan yang telah dimakan oleh ikan digunakan untuk kelangsungan hidup dan selebihnya akan dimanfaatkan untuk pertumbuhan.

Ikan akan hidup, tumbuh, dan berkembang dengan baik pada habitat atau lingkungan dalam batas yang dapat ditolelir oleh ikan. Ikan-ikan air tawar mempunyai tekanan osmotik cairan internal (dalam tubuh) lebih besar dari tekanan osmotik eksternal (lingkungan), sehingga garam-garam dalam tubuh cenderung keluar sedangkan air cenderung masuk kedalam tubuh (Kadarini, 2009*dalam* Warisah, 2013).

Peningkatan padat tebar ikan akan berpengaruh terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan, artinya bahwa peningkatan padat tebar ikan belum tentu menurunkan tingkat kelangsungan hidup. Walaupun terlihat kecenderungan bahwa semakin meningkat padat tebar ikan, maka tingkat kelangsungan hidup akan semakin kecil (Rukmana, 2003). Sintasan yang rendah dapat terjadi karena ikan mengalami kekurangan makan berkepanjangan, akibat tidak terpenuhinya energi untuk pertumbuhan dan mobilitas karena kandungan gizi pakan tidak mencukupi sebagai sumber energi. Salah satu upaya untuk mengatasi rendahnya sintasan yaitu dengan pemberian pakan yang tepat baik dalam ukuran, jumlah, dan kandungan gizi dari pakan yang diberikan (Wijayanti, 2010 *dalam* Nifa, 2013).

Faktor-faktor yang mempengaruhi sintasan adalah lingkungan baru, stres, dan keberadaan bibit penyakit. Faktor dari dalam tubuh adalah kemampuan dalam menyesuaikan diri dengan lingkungan baru dan umur ikan. Kemampuan renang ikan juga mempengaruhi laju sintasan. Ikan yang



kemampuan renangya masih belum sempurna menyebabkan kemampuannya dalam mencari pakan terbatas. Maka dari itu ikan cenderung hanya memakan pakan alami yang berada didekatnya (Melianawati dan Imanto, 2004 dalam Nifa, 2013).

Untuk mengetahui sintasan ikan selama penelitian maka digunakan rumus menurut Chusing *dkk*, (2005) yaitu:

$$SR = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

Keterangan :

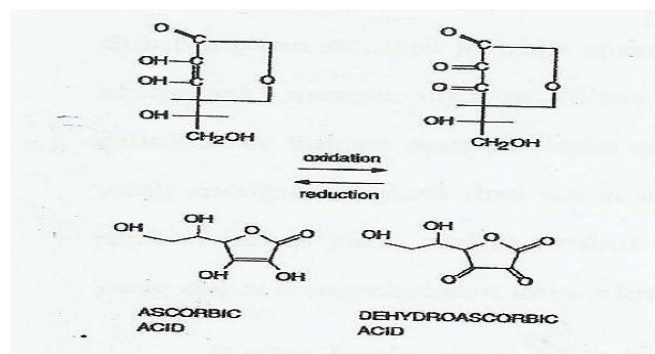
SR = Kelangsungan hidup hewan Uji (%).

N<sub>t</sub> = Jumlah ikan uji pada akhir penelitian (ekor).

N<sub>0</sub> = Jumlah ikan uji pada awal penelitian (ekor).

## 2.4 Asam Askorbat (vitamin C)

Asam askorbat (vitamin C) adalah 6 atom karbon lakton yang disintesis dari glukosa yang terdapat dalam liver. Nama kimia dari asam askorbat 2-*oxo-L-threo-hexono-1,4- lactone-2,3-enediol*. Bentuk utama dari asam askorbat yang dinamakan adalah *Lascorbic* dan *dehydroascorbic acid* (Naidu, 2003). Untuk lebih jelasnya tentang struktur kimia asam askorbat dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Struktur Kimia Asam askorbat (vitamin C)  
(sumber : Hart, 1987)

Asam askorbat (vitamin C) adalah vitamin yang dapat larut dalam air dan sangat penting untuk biosintesis *kolagen*, *karnitin*, dan berbagai *neurotransmitter*. Kebanyakan tumbuhan dan hewan dapat mensintesis asam askorbat untuk kebutuhannya sendiri. Akan tetapi manusia dan golongan primata lainnya tidak dapat mensintesis asam askorbat disebabkan karena tidak memiliki enzim *gulunolactone oxidase*, begitu juga dengan marmut dan kelelawar pemakan buah. Oleh sebab itu asam askorbat harus disuplai dari luar tubuh terutama dari buah, sayuran, atau tablet suplemen vitamin C. Banyak keuntungan di bidang kesehatan yang didapat dari fungsi asam askorbat, seperti fungsinya sebagai antioksidan, anti *atherogenik*, immunomodulator dan mencegah flu (Naidu, 2003). Akan tetapi untuk dapat berfungsi dengan baik sebagai antioksidan, maka kadar asam askorbat ini harus terjaga agar tetap dalam kadar yang relatif tinggi di dalam tubuh (Yi li, 2007 dalam Siregar, 2009).

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif (Iswara, 2009).

## **2.5 Manfaat Asam Askorbat Pada Ikan**

Asam askorbat (vitamin C) penting bagi ikan karena mempunyai banyak fungsi. Dalam metabolisme tubuh, asam askorbat berperan sebagai kofaktor reaksi-reaksi hidroksilasi dalam sel, agen reaksi *redoks*, anti *oksidan*,

*lipolisis* dan *lipogenesis*. Namun ikan tidak mampu mensintesis asam askorbat disebabkan tidak tersedianya *L-glunolakton*, sebagai reaksi tahap akhir sintesis asam askorbat, sehingga untuk mencukupi kebutuhan asam askorbat dalam menjaga fungsi normal sel dibutuhkan suplementasi asam askorbat (vitamin C) dari luar tubuh.

Masumoto *dkk*, (1991). Menjelaskan bahwa pembentukan kolagen penting untuk pertumbuhan normal ikan karena kolagen merupakan komponen utama pada matriks tulang. Asam askorbat (vitamin C) diserap dengan cepat pada jaringan dimana kolagen dibentuk, yaitu di kulit, sirip punggung, tulang rawan mulut, kepala, rahang, tulang rawan penunjang insang dan tulang ikan. Peranan asam askorbat dalam sintesis kolagen dimulai dari proses *hidroksilasi* dua asam amino *prolin* dan *lisin* menjadi *hidroksiprolin* dan *hidroksilisin*. Kedua asam amino ini merupakan komponen utama dalam formulasi kolagen. Dalam prosesnya melibatkan enzim prolil lisil hidroksilase, oksigen, ion ferro, -ketoglutarat dan Asam askorbat. Peranan utama Asam askorbat pada reaksi ini adalah untuk mengubah feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) menjadi fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) atau untuk mempertahankan bentuk ion fero. Pembentukan kolagen yang optimal sangat ditentukan oleh cukup tidaknya kadar asam askorbat (vitamin C) dalam pakan.

Telah banyak penelitian tentang peranan dan kebutuhan asam askorbat pada ikan seperti halnya untuk meningkatkan pertumbuhan, mengatasi *stress*, meningkatkan reproduksi dan meningkatkan imunitas terhadap serangan penyakit. Beberapa penelitian telah memperlihatkan bahwa suplementasi asam askorbat (vitamin C) dalam ransum telah memperbaiki pertumbuhan

dan meningkatkan kelangsungan hidup(Adelinadkk, 2005). Percobaan Subyakto (2000) menunjukkan bahwa kadar APM 25 mg/kg pakan memberikan pertumbuhan terbaik juvenil kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*).

Jusadi dkk. (2006) juga mengungkapkan bahwa penambahan vitamin C dalam pakan pada dosis 100 mg/kg pakan menghasilkan pertumbuhan ikan patin tertinggi. Penelitian Sunarto dkk. (2008) membuktikan bahwa pemberian vitamin C pada ikan betok dengan kadar lebih besar dari 375 mg/kg pakan dapat meningkatkan laju pertumbuhan dan sintasan ikan betok. Daya tahan ikan betok terhadap stres lingkungan meningkat dengan meningkatnya kadar vitamin C dalam pakan yang diberikan.

## **2.6 Kualitas Air**

Air merupakan faktor terpenting dalam budidaya ikan, tanpa air ikan tidak akan bisa hidup. Oleh karena itu, kualitas air harus diperhatikan agar budidaya ikan dapat berjalan sesuai dengan yang diharapkan. Kualitas air merupakan faktor penting selama pembesaran berlangsung. Baik buruknya kualitas air sangat menentukan hasil yang akan dicapai. Kualitas air yang memenuhi syarat merupakan salah satu kunci keberhasilan budidaya ikan (Afrianto dan Liviawaty, 2005). Menurut Zonneveld dkk(1991) dalam astuti (2015), kualitas air sangat penting, tidak hanya untuk ikan, tetapi untuk semua kehidupan dalam perairan. Oleh karena itu, pengelolaan kualitas air dalam budidaya ikan / udang mutlak mendapatkan perhatian utama. Penurunan kualitas air akan berakibat buruk terhadap pertumbuhan dan tingkat kelangsungan hidup ikan dan udang. Menurut Wardoyo (1994) dalam

Astuti (2015), beberapa parameter kualitas air yang perlu dipantau antara lain : pH air, temperatur, oksigen terlarut, dan karbondioksida bebas.

### **2.6.1 Suhu**

Suhu merupakan salah satu faktor fisika yang sangat berpengaruh bagi kehidupan ikan. Suhu mempengaruhi aktifitas fisika dan kimia dalam perairan. Pada dasarnya suhu dipengaruhi oleh musim, letak lintang (*latitude*), ketinggian dari permukaan laut, waktu dalam hari, sirkulasi udara, penutupan awan, serta kedalaman badan air (Haslam, 1995 *dalam* Effendi, 2003). Peningkatan suhu akan mengakibatkan meningkatnya reaksi kimia dalam air, meningkatnya proses metabolisme makhluk air dan menurunkan kadar oksigen dalam air. Peningkatan metabolisme organisme dalam air akan menambah penggunaan oksigen akibat adanya respirasi. Kenaikan suhu 1<sup>0</sup>C akan meningkatkan penggunaan oksigen 10% (Brown, 1987 *dalam* Effendi, 2003).

Pada umumnya semua jenis ikan mempunyai toleransi terhadap perubahan suhu air yang mendadak. Terjadinya perubahan suhu air yang mendadak akan berdampak kurang baik terhadap ikan. Dampak yang jelas apabila terjadi perubahan suhu air dari dingin ke panas yaitu ikan mengalami stress dengan berenang melonjak-lonjak, mengapung dan bernafas di permukaan. Hal ini dapat menyebabkan kematian pada ikan bila berlangsung lama.

Suhu optimal untuk pertumbuhan ikan di daerah tropis adalah 28-32°C. Pada kisaran tersebut, konsumsi oksigen mencapai 2,2 mg/g berat tubuh per jam. Pada suhu 18-25°C, ikan masih bertahan hidup tapi nafsu makannya

mulai menurun. Suhu air 12-18°C mulai berbahaya bagi ikan, sedangkan pada suhu kurang dari 12°C ikan tropis mati kedinginan (Effendie, 2003). Suhu perairan yang baik untuk pertumbuhan ikan mas adalah 25-30°C (Rukmana, 2003).

#### **2.6.2 Derajat keasaman (*pH*)**

Derajat keasaman lebih dikenal dengan istilah pH. ). pH yaitu suatu ion hidrogen dan menunjukkan suasana air yang berupa asam atau basa. Secara ilmiah, pH air dipengaruhi oleh konsentrasi karbondioksida dan asam lainnya, jika kadar karbondioksida naik maka pH menjadi naik atau sebaliknya (Boyd, 1982 *dalam* Nugroho, 2007). Menurut Khairuman (2008), derajat keasaman (pH) air ditentukan melalui konsentrasi ion H yang digambarkan dengan angka 1-14. Angka 7 menunjukkan air dalam kondisi netral, angka kurang dari 7 menunjukkan air dalam kondisi asam, sedangkan pH air lebih dari 7 menunjukkan air dalam kondisi basa.

Parameter pH air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena mempengaruhi kehidupan jasad renik. Perairan asam akan kurang produktif dan juga dapat membunuh hewan budidaya. Pada umumnya nilai pH turun bersama dengan turunnya kandungan mineral yang ada dalam perairan (Effendie, 2003). Pada pH rendah (asam) kandungan oksigen terlarut akan berkurang sebagai akibatnya konsumsi oksigen berkurang aktivitas pernapasan naik dan selera makan akan berkurang. Hal sebaliknya juga terjadi pada kondisi perairan yang basa. Pertumbuhan ikan yang baik terjadi pada pH antara 6-7 (netral), meskipun tergantung jenis ikannya. pH optimal untuk ikan mas adalah kisaran 7-9 (Rukmana, 2003).